

⑫ 公開特許公報(A) 平3-147799

⑤Int. Cl. ⁵

識別記号

庁内整理番号

④③公開 平成3年(1991)6月24日

C	12	Q	1/68
C	07	H	21/04
C	07	K	13/00
C	12	N	15/11

A 6807-4 B
7822-4 C
8619-4 H

ZNA
ZNA

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全6頁)

⑤4発明の名称 新規なオリゴヌクレオチドプローブ

②特 願 平1-284909

②出 願 平 1 (1989)11月 2 日

⑦発 明 者 橋 本 保 埼玉県朝霞市栄町1丁目5番10号

⑦発 明 者 黒 瀬 光 一 埼玉県川越市南台3丁目7番22号

⑦出 願 人 ヘキストジャパン株式 東京都港区赤坂8丁目10番16号
 会社

⑦④代 理 人 弁理士 高 木 千 嘉 外 2 名

明細音

1. 発明の名称 新規なオリゴヌクレオチド
 ブロープ

2. 特許請求の範囲

(1) 下記の塩基配列またはその相補鎖のうち、少なくとも連続した12個の好ましくは20個以上の塩基配列を含むことを特徴とする核酸オリゴヌクレオチドプローブ。

[illegible]

(2) 下記の塩基配列またはその相補鎖を有すること
を特徴とする請求項1の標識オリゴヌクレオチ
ドプローブ。

CN GGACAGTGAGGGTGGGAXGYXGCYTGATGCAGGGAGTGAGGZX

(式中、Nは、A、GまたはC、Xは、AまたはG、Yは、CまたはG、Zは、AまたはCである)

(3) 下記の塩基配列を有することを特徴とする請求項2の標識オリゴヌクレオチドプローブ。

CAGGACAGTGAGGGTGGGAAGGAGCCTGATGCAGGGAGTGAGGGCG

(4) 酵素、ラジオアイソトープ、および化学ルミネッセンス発光体により標識されたことを特徴とする請求項1～3のいずれかの項に記載の標識オリゴヌクレオチドプローブ。

(5) 請求項 1～4 のいずれかの項に記載の標識オリゴヌクレオチドプローブを含む遺伝子診断キット。

3. 発明の詳細な説明

本発明は遺伝子診断のDNAプローブとして使用できる新規なミニサテライトDNAに関する。

近年DNAプローブを用いた種々の遺伝子診断法が開発されてきている。遺伝子診断の目的には1)遺伝病の早期診断、2)いわゆるDNAフィンガープリント法とよばれる親子鑑別や犯罪捜査への応用、3)ウイルスや細菌感染症の原因菌の高感度の診断などがあげられる。

これらのうち、DNAフィンガープリント法はひろく個人識別に用いることができる。その方法としては、目的の遺伝子の全部又は一部をDNAプローブとして、その遺伝子上の変異を直接検出する方法、遺伝子周辺の部位の制限酵素部位の変異を利用した制限酵素断片多形(RFLP: restriction fragment length polymorphism)解析法があげられ、また遺伝子の非コード部分にしばしば見い出される反復配列DNAをプローブとして利用することもできる。

このような、いわゆるミニサテライトDNAは、個人識別や家系識別にも利用できることが報告されている(例えば、Nucleic Acid Research, Vol.16, 10953-10971, 1988; Science, Vol.235,

1616-1622, 1987)。ミニサテライトDNAとは、10から100塩基配列が一つの反復単位で、それらがタンデムに繰り返したいわゆる反復配列DNAである。反復度は、多いものでは1000回にも及び、この反復度が個々の対立遺伝子で異なることにより、パリエーションを獲得している(総説:小南凌, 実験医学, Vol. 7, No2, p.26-30 1989)。

これらのDNAフィンガープリント法によって検出可能な遺伝子上の変異のパターンはメンデル遺伝により親から子に伝えられていく。これを利用して、より正確な親子診断が可能とされ、またDNAポリメラーゼ増幅(polymerase chain reaction; PCR)と組み合わせた高感度測定法により、毛根や精液、血液、皮膚片等の微量サンプルからこれら個人ごとに異なるパターンを利用して犯罪者や被害者の同定ができる犯罪捜査への応用が可能となる。

本発明により提供されるミニサテライトDNAはヒト血漿中に含まれる、線溶系の制御に関与するプロテアーゼインヒビターの種類である、

α_2 -プラスミンインヒビターの遺伝子の近傍に本発明者により見い出された塩基配列である。

ヒト α_2 -プラスミンインヒビターは、正常人の血液中に通常6 μ g/dl程度検出され、血栓溶解作用を持つプラスミンを阻害して、血栓溶解の昂進を抑え、ひいては炎症や癌の転移などの様々な異常な生理現象の防止に寄与していると考えられている。

本発明者等は、ヒト α_2 -プラスミンインヒビターの遺伝子を単離し、その発現を調節する上流領域を解析したところ、45ヌクレオチドのDNA配列がタンデムに繰り返している領域を見い出した。さらに、その領域を含むXbaI/BamHI断片をCATアッセイ用のプラスミドベクターにクローニングし、ヘルペス単純ウイルスのチミジンキナーゼのプロモーター活性に与える影響を調べたところ、その活性を抑制するサイレンサー様の機能を見い出した。その配列は、
CNGGACAGTGAGGGTGGGAGXGCGTCATGCAGGAGTGAGGZX
(式中、Nは、A、GまたはC、Xは、Aまたは

G、Yは、CまたはG、Zは、AまたはCである)

である。

この配列を持つオリゴヌクレオチドを標識してプローブとし、ヒト染色体DNAを適当な制限酵素で消化してアガロースゲル中で電気泳動したものとサザンブロット/ハイブリダイゼーションを行うことにより、制限酵素切断断片のパターンの違いを検出したり、この反復配列のコピー数を測定することができる。

本発明者等がヒト α_2 -プラスミンインヒビター遺伝子の近傍に見い出したミニサテライト配列は、45ヌクレオチドからなり、その中には少なくとも7か所のヘテロガスな部位がみられる。これは、ポリメラーゼチェーンリアクション法によって、直接的に配列を決定することにより、より特異性の高い個人、家系識別に利用できる可能性もある。ヒト α_2 -プラスミンインヒビターの遺伝子断片として特開昭64-2577(昭和64年1月6日公開)が開示されているが、この出願において開示され

ている塩基配列はcDNAのそれでありリーダ配列の最初のメチオニン残基（成熟 α_2 -プラスミンインヒビター蛋白のアミノ末端のアスパラギン残基を+1としたとき-39番目のアミノ酸残基に相当する）から下流に関する。本発明者は α_2 -プラスミンインヒビターの染色体の遺伝子をクローニングし、第1エクソンのさらに上流に本発明で開示されたミニサテライトDNA配列を見出し、本発明を完成させたものである。

これらのDNAプローブの標識は、一般にはラジオアイソトープ(RI)が感度の良さから最も用いられているが、最近では酵素や化学ルミネッセンス発光体で標識する非RI法も操作上の安全の高さ、特別な施設を必要としないことなどから用いられるようになった。RI標識法としてはT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて³²Pを5'-端に標識する方法、あるいはDNAポリメラーゼIとDNase Iを組み合わせて³²P-標識デオキシトリヌクレオチドを標識するニックトランスレーション法があり、これらの標識方法は

ダイズを形成し、特異的なシグナルを発生させるためには、12個以上のオリゴヌクレオチドであれば、検出可能だが、より非特異的な反応のバックグラウンドをおさえて、シャープで正確なパターンを検出させるためには12~17個以上、好ましくは20個以上の長さを有するオリゴヌクレオチドが使用できる。

したがって、本発明のプローブは、

[illegible]

の塩基配列またはその相補鎖のうち、どこを開始

市販の専用キット（例えばアメリカのBethesda Research Laboratories、日本ではコスモバイオ株式会社より市販されている）を用いて実施できる。また、非 R I 標識および検出方法にはホースラディッシュペルオキシダーゼ（H R P : horse radish peroxidase）で D N A を標識し H R P により触媒されるルミノール酸化反応に伴うケミカルルミネッセンスを検出する方法、ビオチン化 d U T P で標識した D N A をアビジン・アルカリフォスファターゼコンプレックスによる化学呈色反応で検出する方法があげられ、これら標識方法は市販のキット（例えばアマシャム社より市販されている）を用いて実施することができる。

またこれらのプローブDNAは、数10個の塩基長を有する比較的短いオリゴヌクレオチドの場合は市販のDNA合成機（例えば米国アプライドバイオシステム社のABI381A）により化学合成もできる。また塩基鎖が長い場合には適当な遺伝子の断片をクローン化して分離精製することもできる。機械DNAプローブが、安定したハイブリ

点としてもよいが少なくとも12個の塩基配列を含んでいけばよい。

本発明をより具体的に説明するために以下に実施例を示す。しかし、本実施例は、本発明を限定するものではない。

实施例 1

ヒト α_2 - プラスミンインヒビター遺伝子のクローニングおよび同遺伝子上流域による繰り返り DNA 配列の決定

ヒト肝臓 DNA から調製した DNA からファージ λ 47.1 を用いて、ヒト遺伝子ライブラリーを作成し、ヒト α_2 - プラスミンインヒビター c DNA をプローブとし、スクリーニングを行った。得られたポジティブクローンの制限酵素マッピング、塩基配列の決定を行い、ヒト α_2 - プラスミンインヒビター c DNA (Tone ら, J. Biochem. 102, 1033-1041 (1987)) の配列と比較し、ヒト α_2 - プラスミンインヒビター遺伝子のエクソンの位置を決定した。エクソンの DNA 配列は c DNA のそれと 1 か所を除いて完全に一致した。

その1か所とは、コーディング領域の1番目のATGのAから数えて22番目のヌクレオチドで、cDNAではTであるのが、染色体遺伝子ではCであった。この領域は、リーダーペプチドに相当する部分である。また、同遺伝子の上流域に45bpを1反復単位としてタンデムに繰り返している領域を見出した。その位置は、コーディング領域の1番目のATGのAを+1とすると、-3861から-2887にかけての領域であった。図1に、 α_2 -プラスミンインヒビター遺伝子の制限酵素地図、エクソンの位置、45bp反復配列の位置及びその塩基配列を示した。

DNAの調製

ヒト肝臓から、Maniatis, T.ら, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1982)に記載された方法に従って調製した。

ヒト遺伝子ライブラリーの作成

ヒト肝臓から調製したDNAを制限酵素Sau3A Iで部分消化し、ショ糖密度勾配遠心法により分画した。10kbから20kbに相当するDNA

断片を λ L47.1ベクター (アマシャムより購入) に組み込み、Maniatis, T.ら, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1982)に記載されている方法に従って、in vitro packagingを行った。タイトレーションの結果、約 1×10^8 個の独立なファージが存在した。

スクリーニング

ブラックハイブリダイゼーション法によって前記のヒト遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行った。基本的には、Maniatis, T.ら, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1982)に記載されている方法に従った。プローブは、Toneら, J. Biochem. 102, 1033-1041 (1987)に記載されている、ヒト α_2 -プラスミンインヒビターcDNAを使用した。プローブの標識は、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPを用いたニックトランスレーションにより行った。約 1×10^8 個のブラックをニトロセルロースフィルターに転写した後、プローブとハイブリダイゼーションを行い、洗浄後、オートラジオグラフィーを行うことに

よって、ポジティブクローンを検出した。

DNA塩基配列の決定

上記のポジティブクローンよりDNAを調製し、適当な制限酵素で消化し、制限酵素マッピングを行った後、各々の制限酵素による断片をpUC118, pUC119, pHS G398, またはpHS G399 (全て宝酒造社製) のポリリンカー部位にクローニングした。キロシークエンス用デレクションキット (宝酒造社製) を用いて、前記リコンビナントプラスミドのデレクションミュータントを作成し、pUC118またはpUC119にクローニングしたものに関しては、Vieira, J.ら, Methods in Enzymology, 152, 3-11 (1987)に記載されている方法に従って1本鎖DNAを調製し、pHS G398 またはpHS G399 にクローニングしたものに関しては、M13mp18またはM13mp19 (宝酒造社製) に再クローニングした後1本鎖DNAを調製し、Sanger, F., Science, 214, 1205-1210 (1981) に記載された方法に従って、DNAの塩基配列を決定した。

実施例 2

ミニサテライトDNA配列をプローブとしたヒト遺伝子の解析

ヒト α_2 -プラスミンインヒビター遺伝子塩基配列の解析により、45bpミニサテライトDNAの99bp上流と15bp下流にBstXI認識部位が存在することがわかった。血漿中の α_2 -プラスミンインヒビター濃度に関する健常者で血縁関係の知られていない者9人の染色体DNAをBstXIで消化した後、45merの接酸プローブを用い、サザンブロットハイブリダイゼーションを行い、コピー数および制限酵素切断断片の電気泳動パターンを解析した。

DNAの調製

デキストラン比重差遠心により、30mlの血液から得られた白血球を、100mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH8.0, 500 μ g/ml プロテインキナーゼK, 0.5% SDS溶液中に懸濁し、55℃で一晩インキュベーションした。フェノール及びクロロホルムで抽出した後、DNAを

エタノールで沈澱させ、TE緩衝溶液中に溶解した。

核酸プローブ

下記の塩基配列を有する45merのオリゴヌクレオチド

CAGGACAGTGAGGGTGGGAAGGAGCCCTGATGCAGGGAGTGAGGCC

をDNA合成機(ABI, 380A)で合成した。

この45mer, 50pmolを、(γ - 32 P)ATP 3.7 MBq (185 TBq/μmol)、T4ポリヌクレオチドキナーゼ10単位、50mM Tris・HCl pH8.0, 10mM MgCl₂, 5mMジチオスレイトールを含む最終容量30μlの溶液中で、37℃、1時間インキュベーションすることによって、5'末端を 32 Pで標識した。標識後、この溶液をSephadex G50カラムクロマトグラフィにかけ、遊離のヌクレオチド及び(γ - 32 P)ATPを、標識した45merと分離した。

サザンブロットハイブリダイゼーション

前記、白血球から調製したゲノムDNA 15μgをBstXIで消化し、0.8%アガロースゲル板中

で電気泳動し、Blodyneナイロン膜(Pall Bio Support, East Hills, N.Y.)へ、その説明に記載された方法に従って移した。80℃で2時間インキュベーションし、ナイロン膜にDNAを固定した後、同説明書に従って、45merの核酸プローブと42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

洗浄及び露出

ナイロン膜を同説明書に記載された方法に従って洗浄し、サラップで覆った後、フィルム、増感スクリーンと共に-80℃で24~60時間露出下においた。

結 果

BstXIで消化したゲノムDNAのパターンとして、各サンプルそれぞれ2本のバンドが見られた。バンドの位置からその長さを算出すると、鎖長が約8.0, 3.8, 3.4, 1.6, 1.5kbの5種類であった(図2に示した)。45bpのコピー数は以下のようにして計算した。45bpミニサテライトDNAの両末端からBstXI切断部位までの長さ(上流側90bp、下流側22bp)をそれぞれの鎖長から引いて、これ

を45で割った。この計算によると、コピー数は大きい方から、約175, 82, 73, 33, 31となり、これらの値は、それぞれのバンドのX線フィルム上の黒化度とほぼ一致した。

検体(a~i)のそれぞれの鎖長及びコピー数を表1に示す。

表 1

検体	鎖長 kb	コピー数	検体	鎖長 kb	コピー数
a	1.5, 1.6	31, 33	f	1.6, 3.8	33, 82
b	1.8, 3.4	33, 73	g	3.4, 8.0	73, 175
c	3.4, 3.8	73, 82	h	3.4, 3.8	73, 82
d	3.8, 8.0	82, 175	i	3.4, 3.8	73, 82
e	1.8, 8.0	33, 175			

結果は、父親及び母親由来のミニサテライトのコピーが各1種類ずつ存在することを示している。

また、各個人から得られた制限酵素切断断片のパターンは各々いくつかのグループに分かれた。

4. 図面の簡単な説明

図1は α_2 -プラスミンインヒビター遺伝子の制限酵素マップ、エクソンの位置、45bpミニサテライトDNAの位置及びその塩基配列を示してお

り、黒い長方形はエクソンを、白い長方形はミニサテライトDNAを表している。

図2は、9人の染色体DNAをBstXIで消化した後、45merの核酸プローブを用い、サザンブロットハイブリダイゼーションを行ったときのオートラジオグラムである。矢印はバンドの位置を、数字はその長さを示している。

特許出願人 ヘキストジャパン株式会社

代理人 弁理士 高木 千 京 (外2名)



第 1 圖

